

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】令和2年11月12日(2020.11.12)

【公表番号】特表2019-531730(P2019-531730A)
 【公表日】令和1年11月7日(2019.11.7)
 【年通号数】公開・登録公報2019-045
 【出願番号】特願2019-516965(P2019-516965)
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)
 C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)
 C 1 2 Q 1/06 (2006.01)
 C 1 2 M 1/34 (2006.01)
 C 1 2 M 1/00 (2006.01)
 G 0 1 N 37/00 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6869 Z
 C 1 2 Q 1/6844 Z N A Z
 C 1 2 Q 1/06
 C 1 2 M 1/34 Z
 C 1 2 M 1/00 A
 G 0 1 N 37/00 1 0 2
 C 1 2 N 15/09 Z

【手続補正書】

【提出日】令和2年9月25日(2020.9.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

マイクロウェルのアレイを画定する上面を有する少なくとも1つのマイクロ加工デバイスを使用して生物学的実体の集団を含む試料を分析する方法であって、前記マイクロウェル・アレイの複数のマイクロウェルが：

(1) 前記マイクロウェル中に存在し得る1つ以上の目的の生物学的実体の標的核酸フラグメントにアニーリングするための標的的特異的ヌクレオチド配列、および(2) 前記微細加工デバイス上の前記マイクロウェルの位置を同定するための位置特異的ヌクレオチド配列である固有のタグ核酸分子を含み、

前記複数のマイクロウェルのうちの少なくともいくつかのマイクロウェルが、生物学的実体の1つより多くの細胞およびある量の栄養素をそれぞれ含むように、前記微細加工デバイス上にサンプルを充填するステップ；

前記微細加工された装置を所定の条件でインキュベートするステップ；

個々のマイクロウェルにおいて、前記複数のマイクロウェル中での前記インキュベーションから得られた生物学的実体の細胞の選択された遺伝物質を増幅し、それにより前記複数のマイクロウェルの少なくともサブセット中の第一アンプリコンを獲得するステップ；

前記複数のマイクロウェルのサブセットから収集された前記第1のアンプリコンの集合

体の配列を決定して配列決定データを獲得するステップ；および、

前記配列決定データおよび複数のマイクロウェルのそれぞれに含まれる前記固有のタグ核酸分子に基づいて、前記少なくとも1つの微細加工デバイスの前記複数のマイクロウェルのサブセットのそれぞれに存在する生物学的実体の識別を獲得するステップからなる方法。

【請求項2】

前記複数のマイクロウェルのサブセットの各々に存在する生物学的実体の識別に基づいて、前記サンプルに含まれる生物学的実体の集団における少なくとも2つの異なる種類の生物学的実体の間の関係の有無を決定するステップをさらに含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記関係が、従属関係、共生関係、および破壊的关系を含むことを特徴とする請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記関係の有無が、インキュベーション後に前記同じマイクロウェル内にどの種類の生物学的実体が存在するか存在しないかを前記複数のマイクロウェルにわたって比較することによって決定されるステップをさらに含む請求項2に記載の方法。

【請求項5】

前記微細加工デバイス上への前記サンプルの充填が、平均して、ここでNは2以上の数である前記任意の生物学的実体のうちのN個の細胞を含むように実行するステップを含む請求項2に記載の方法。

【請求項6】

Nが20以下であることを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記生物学的実体が細菌を含むことを特徴とする請求項2に記載の方法。

【請求項8】

前記2つの異なる種類の生物学的実体が、2つの異なる株、2つの異なる種、または2つの異なる属の細菌を含むことを特徴とする請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記サンプル中の前記生物学的実体の集団が、特定の環境に自然に存在する微生物のコレクションを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記生物学的実体が真核細胞を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項11】

インキュベーションの前に、前記微細加工デバイスの上面に膜を適用して、前記生物学的実体を前記複数のマイクロウェル内に保持するステップをさらに含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項12】

前記栄養素が前記マイクロウェルに予め充填され、前記膜によって保持されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記サンプルを充填することが、前記少なくとも1つの微細加工デバイスの前記マイクロウェルにわたって複数の異なる栄養素を充填するステップを含むことを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記試料を装填することが、前記少なくとも1つの微細加工デバイスの前記マイクロウェルにわたって複数の異なる栄養素を充填することを含み、少なくとも2つのタイプの生物学的実体の間の関係の有無が異なる栄養素に依存するものかについて決定するステップを含むことを特徴とする請求項2に記載の方法。

【請求項15】

前記栄養素が、前記膜上および前記マイクロウェルの外部に設けられた貯蔵部に含まれ

、前記膜が前記栄養分に対して透過性であり、前記栄養分が前記貯蔵部から前記膜を通して前記マイクロウェルに移動することを可能にすることを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記細胞の選択された遺伝物質が前記細胞のゲノム DNA であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記インキュベーションから得られた前記生物学的実体の細胞の少なくともいくつかを標的位置に移すステップにおいて、前記増幅および配列決定は、前記標的位置に移されない細胞または前記標的位置に移される細胞のいずれかに対して行われることをさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記複数のマイクロウェルのそれぞれの中の固有のタグ核酸分子が、前記増幅に使用される PCR プライマーの一部を構成することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記少なくとも 1 つの微細加工デバイスのマイクロウェルアレイの表面密度が、cm²あたり少なくとも 150 マイクロウェル、cm²あたり少なくとも 250 マイクロウェル、cm²あたり少なくとも 400 マイクロウェル、cm²あたり少なくとも 500 マイクロウェル、cm²あたり少なくとも 750 マイクロウェル、cm²あたり少なくとも 1,000 マイクロウェル、cm²あたり少なくとも 2,500 マイクロウェル、cm²あたり少なくとも 5,000 マイクロウェル、cm²あたり少なくとも 7,500 マイクロウェル、cm²あたり少なくとも 10,000 マイクロウェル、cm²あたり少なくとも 50,000 マイクロウェル、cm²あたり当たり 100,000 マイクロウェル、または cm²あたり少なくとも 160,000 であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記少なくとも 1 つの微細加工デバイスのマイクロウェルの前記アレイのそれぞれのマイクロウェルが、約 5 μm から約 500 μm、約 10 μm から約 300 μm、または約 20 μm から約 200 μm までの直径を有することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

マイクロウェルのアレイを画定する上面を有する少なくとも 1 つの微細加工デバイスを使用して生物学的実体の集団を含む試料を分析する方法であって、

前記マイクロウェルの前記アレイの複数のマイクロウェルのそれぞれには、(1) 前記マイクロウェルに存在する 1 つ以上の目的の生物学的実体の標的核酸フラグメントにアニーリングするための標的特定のヌクレオチド配列、および、(2) 前記少なくとも 1 つの微細加工デバイス上の前記マイクロウェルの位置を識別するための位置特定のヌクレオチド配列である固有のタグ核酸分子が充填され、

前記複数のマイクロウェルのうちの少なくともいくつかのマイクロウェルがそれぞれ、生物学的実体の 1 つより多い細胞およびある量の栄養素を含むように、前記微細加工されたデバイス上にサンプルを装填するステップ；

前記微細加工された装置を所定の条件でインキュベートするステップ；

前記少なくとも 1 つの微細加工デバイスの前記複数のマイクロウェルの少なくともサブセットにおけるインキュベーションから得られた生物学的実体の細胞の選択された遺伝物質を増幅し、それによって複数のマイクロウェル中の第 1 の単位複製配列を獲得するステップ；

前記複数のマイクロウェルのサブセットから収集された前記第 1 のアンプリコンの集合体を配列決定して配列決定データを取得するステップ、および、

配列決定データおよび前記複数のマイクロウェルのそれぞれに含まれる固有のタグ核酸分子に基づいて、前記少なくとも 1 つのマイクロ加工デバイスの複数のマイクロウェルのサブセットのそれぞれに存在する生物学的実体の識別を獲得するステップからなる方法。

【請求項 2 2】

マイクロウェルのアレイを画定する上面を有する少なくとも 1 つのマイクロ加工デバイ

スを使用して、特定の環境から収集された微生物のマイクロバイームを分析する方法であって、

(1) 前記マイクロウェル中に存在し得る1つ以上の目的の生物学的実体の標的核酸フラグメントにアニーリングするための標的的特異的ヌクレオチド配列、および(2) 前記マイクロウェルの位置を同定するための位置特異的ヌクレオチド配列を含み、

前記マイクロバイームから調製されたサンプルを前記少なくとも1つの微細加工デバイス上に充填して、前記複数のマイクロウェルがそれぞれ平均して2~20個のマイクロバイームの任意の微生物の細胞ならびにある量の栄養素を含むようにするステップ；

前記微細加工された装置を所定の条件でインキュベートするステップ；

前記インキュベーションから得られた微生物の選択された遺伝物質を前記少なくとも1つの微細加工デバイス中の前記複数のマイクロウェルの少なくともサブセット中で増幅し、それによって複数のマイクロウェル中の第1のアンプリコンを獲得するステップ；

配列決定データを得るために、前記複数のマイクロウェルの前記サブセットから収集された第1のアンプリコンの凝集体を配列決定するステップ、および、

前記配列決定データおよび前記複数のマイクロウェルのそれぞれに含まれる固有のタグ核酸分子に基づいて、前記少なくとも1つのマイクロ加工デバイスの複数のマイクロウェルのサブセットのそれぞれに存在する微生物の識別を取得し、

前記複数のマイクロウェル中に存在する微生物の同定に基づいて、マイクロバイーム中の少なくとも2つの異なる種類の微生物間の関係の有無を決定するステップからなる方法。

【請求項23】

特定の環境から収集されたマイクロバイームの微生物間の関係を分析する方法であって、

前記マイクロバイームの微生物を複数の部分に分けるステップにおいて、それぞれ平均して2~20細胞のマイクロバイームの微生物が含まれ；

前記微生物の複数の部分の各部分を、前記栄養素の存在下で、所定の条件で別々の区画でインキュベートするステップ；

インキュベーション後、前記単離された区画の少なくともサブセットのそれぞれに存在する微生物を同定するステップ；および、

前記識別された微生物の種類が前記同じマイクロウェルに存在するか存在しないかの区画のサブセットにわたる比較に基づいて、前記マイクロバイーム中の少なくとも2つの異なる種類の微生物間の関係の有無を決定するステップからなる方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0006】

複数の実施形態において、生物学的実体の個体群を含む標本の分析方法を提供する。この方法は、マイクロウェルのアレイが定められた(または含まれた)上面を有する少なくとも一つの微細加工されたデバイスを用いることができ、マイクロウェルのアレイの複数のマイクロウェルのアレイには、固有のタグ核酸分子であり、(1) マイクロウェルの中に存在する一つまたはそれ以上の生物学的実体の標的となる核酸フラグメントにアニーリングするための標的的特異性核酸配列(a target-specific nucleic sequence)および(2) マイクロウェルの位置を同定するための位置特異性ヌクレオチド配列を含む。この方法は、複数のマイクロウェルのうちの少なくともいくつかのマイクロウェルがそれぞれ1つ以上の細胞の生物学的実体およびある量の栄養素をそれぞれ含むように、微細加工デバイス上にサンプルを装填することを含み、微細加工された装置を所定の条件でインキュベートし、個々のマイクロウェルの中で、複数のマイクロウェル中のインキュベーションから得られた生物学的実体の細胞の選択された遺伝物質(例えば、細胞のゲノムDNA)を

増幅し、それにより複数のマイクロウェルの少なくともサブセット中の第一アンプリコンを得て、複数のマイクロウェルのサブセットから収集された第1のアンプリコンの集合体を配列決定して配列決定データを得て、配列決定データおよび複数のマイクロウェルのそれぞれに含まれる固有のタグ核酸分子に基づいて、少なくとも1つのマイクロ加工デバイスの複数のマイクロウェルのサブセットのそれぞれに存在する生物学的実体の識別を得る。